

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 625**

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2007 PCT/EP2007/056454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2008 WO08000783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2007 E 07730314 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2043684**

54 Título: **Procedimiento de producción de alérgeno hidrolizado**

30 Prioridad:

29.06.2006 EP 06116322
06.09.2006 US 842485 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2018

73 Titular/es:

ASIT BIOTECH S.A (100.0%)
avenue Ariane 5
1200 Bruxelles, BE

72 Inventor/es:

LEGON, THIERRY;
PIROTON, SABINE;
PLACIER, GAEL y
KERGOAT, GILLES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 657 625 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de alérgeno hidrolizado

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de un hidrolizado de alérgeno purificado y el hidrolizado de alérgeno obtenible mediante el nuevo procedimiento.

Los alérgenos comunes son pólenes, ácaros del polvo doméstico, mohos, fármacos, alimentos y pelo de animales y caspa.

10 Las enfermedades alérgicas más comunes son la rinitis, el asma y la dermatitis atópica. El asma alérgica es un trastorno inflamatorio crónico. El tratamiento sintomático de los trastornos alérgicos se efectúa mediante el uso de antihistamínicos, antagonistas β y corticosteroides.

15 Además, la denominada inmunoterapia "específica" se basa en una hiposensibilización. Típicamente, se administra a los pacientes una inyección subcutánea de alérgenos ofensivos específicos. El tratamiento comienza con pequeñas dosis de alérgenos y las dosis aumentan. El tratamiento generalmente se mantiene durante varios años. Este tipo de tratamiento adolece del cumplimiento puro del paciente y ha sido cuestionado por razones de seguridad porque un paciente puede sufrir reacciones anafilácticas graves.

Además de los procedimientos que comprenden inyecciones subcutáneas repetidas, también hay procedimientos de hiposensibilización oral.

20 El documento US 4.822.611 divulga un procedimiento para tratar alergias que comprende el tratamiento oral con alérgenos. Describe el uso de extractos alérgicos "a granel" disponibles comercialmente que muestran la variación de lote a lote y las diferencias en los extractos de diferentes fabricantes. La preparación de estos extractos no se describe.

El documento GB 1 247 614 divulga un procedimiento para extraer un alérgeno. El objetivo de este procedimiento es tener un extracto alérgico más completo y eficaz al incluir todos los componentes extraíbles del alérgeno.

25 El documento US 5.770.698 divulga un proceso para purificar extractos de proteínas alérgicamente activas. El espectro de la figura 2 no presenta un pico a 280_{nm}. Esto implica que el extracto contiene una cantidad significativa de impurezas no proteicas. El documento WO 99/22762 divulga un procedimiento similar, por lo tanto, el producto también comprende grandes cantidades de impurezas no proteicas.

30 Por otro lado, ha habido una tendencia a desarrollar preparaciones altamente específicas basadas en epítopos individuales. Por ejemplo, el documento WO 00/58349 divulga un péptido aislado y purificado que comprende una leucina situada dos enlaces peptídicos más allá de un par de tirosina/arginina. Estos péptidos pueden usarse para preparar una composición farmacéutica para llevar a cabo el tratamiento o la profilaxis, en este caso especialmente dirigida a la alergia canina en perros.

Por un lado, los procedimientos se usan para purificar una molécula alérgica individual específicamente identificada. Por otro lado, las personas están tratando de producir extractos alérgicos lo más completos posible.

35 De acuerdo con la primera alternativa, siempre es posible que la preparación alérgica carezca de los epítopos relevantes para inducir tolerancia en un paciente determinado. La segunda alternativa tiene el inconveniente de la variabilidad de lote a lote y de la presencia de compuestos capaces de desencadenar la respuesta inmune como moléculas de ADN, carbohidratos, lípidos de complejos de los mismos.

40 Un objeto de la presente invención es superar al menos algunos de los inconvenientes de la técnica anterior, especialmente para proporcionar antígenos de alérgenos naturales con una capacidad reducida significativa para desencadenar una reacción de alergenidad en comparación con el extracto de alérgeno sin purificar, pero capaz de estimular también células T.

45 El problema se resuelve mediante la provisión de procedimientos para preparar un extracto alérgico que comprende la mayoría de las partes que contienen proteína de un extracto de alérgeno, pero con un contenido reducido, preferiblemente muy bajo, de componentes no proteicos tales como ácidos nucleicos, lípidos, azúcares y similares.

Los extractos preparados de acuerdo con la invención son superiores a los extractos de la técnica anterior, especialmente muestran una composición reproducible de proteínas, pero no se purifican hasta un único epítipo.

Un procedimiento para la producción de un hidrolizado de alérgeno purificado que comprende las etapas de

- 50 a) extraer una fuente natural de alérgenos que comprende proteínas alérgicas para formar un extracto,
b) purificación de dicho extracto para eliminar componentes no proteicos para formar un extracto purificado,

c) desnaturalizar dicho extracto purificado para formar un extracto desnaturalizado purificado, en el que la desnaturalización se realiza con mezclas de agentes caotrópicos y agentes reductores,

5 dicho extracto desnaturalizado purificado que comprende proteínas, en el que ninguna proteína individual es el 60 % o más (p/p) de todas las proteínas medidas por SDS-PAGE seguido de densitometría y todas las proteínas representan al menos 60 % (p/p) del peso seco del extracto desnaturalizado purificado medido por un ensayo de BCA,

d) hidrolizar dicho extracto desnaturalizado purificado con una enzima para formar un hidrolizado de alérgeno,

10 e) purificar dicho hidrolizado de alérgeno para eliminar péptidos con un peso molecular superior a 10.000 Da e inferior a 1.000 Da con el fin de obtener un hidrolizado purificado en el que el 70 %, más preferentemente el 80 % de los péptidos están entre 10.000 Da y 1.000 Da.

Las etapas a) a c) se refieren a la parte I del procedimiento

En contraste con los procedimientos de la técnica anterior, el procedimiento de la presente invención produce extractos de alérgenos que comprenden predominantemente proteínas sin purificación del extracto hasta un único péptido o proteína.

15 A diferencia de los productos de la técnica anterior, los productos de la invención tienen las siguientes ventajas:

- Las sustancias inmunogénicas distintas de las proteínas se eliminan sustancialmente

- El extracto de alérgeno natural es capaz de estimular células T con la capacidad reducida de desencadenar una reacción alérgica inmediata (activación de basófilos, desgranulación de mastocitos)

20 Como materiales de partida se pueden usar diferentes alérgenos naturales. Los materiales de partida naturales típicos son leche, veneno, huevo, hierba, pasto, árbol, arbusto, flor, vegetal, grano, hongos, fruta, baya, nuez, semilla, judía, pescado, marisco, marisco, carne, especias, insecto, ácaro, moho, animal, garrapata, gusano, coral blando, caspa animal, nematodo, Hevea brasiliensis y mezclas de los mismos.

25 Después de la extracción del material, el extracto se purifica para eliminar componentes no proteicos tales como azúcares, lípidos, ácidos nucleicos y similares. Típicamente, varias proteínas diferentes están presentes en la fracción proteica del extracto purificado.

De acuerdo con la técnica anterior, una proteína se purifica y las otras proteínas restantes son "impurezas".

En contraste con esto, el objetivo de la presente invención es purificar las proteínas juntas. Las cantidades relativas de las proteínas en el extracto purificado se pueden medir fácilmente usando procedimientos como SDS-PAGE seguido de densitometría.

30 Para el 60 % del peso total de las proteínas, es necesario combinar al menos las dos proteínas más dominantes, es decir, ninguna proteína individual es 60 % (p/p) o más de todas las proteínas. Más preferiblemente, el 60 % de todas las proteínas están formadas por al menos las 3 proteínas dominantes, preferiblemente por al menos las 4 proteínas dominantes y más preferiblemente por al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10 proteínas.

Por ejemplo, existen las siguientes proteínas:

35

Proteína 1:	27 %
Proteína 2:	13 %
Proteína 3:	34 %
Proteína 4:	19 %
Proteína 5:	17 %

Las proteínas más dominantes que forman juntas al menos 60 % ($\approx 60\%$ o más) son proteínas 3 + 1 (34 + 27 = 61 %).

Además, el contenido de proteína total del extracto purificado es al menos 60 % en peso, preferiblemente el contenido es al menos 70 % en peso o 80 % en peso, más preferiblemente 90 % en peso del extracto purificado.

40 La extracción se realiza preferiblemente con soluciones acuosas. Las sales adecuadas son sales tales como, pero

sin limitación, carbonato, bicarbonato, fosfato, acetato, TRIS y HEPES.

También, en contraste con muchos otros procedimientos de extracción, se prefiere que la cantidad de medio de extracción sea comparativamente grande, es decir, al menos 20 veces el peso de la fuente natural de alérgenos, preferiblemente 100 veces el peso o más.

5 La purificación del extracto puede realizarse por uno o más de los siguientes procedimientos:

- etapas de cromatografía de intercambio iónico (incluida la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio catiónico),

- la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (también llamado filtración en gel),

- etapas de precipitación,

10 - etapas de cromatografía de interacción hidrófoba,

- cromatografías de pseudoafinidad y afinidad y/o

- diafiltración.

15 En una realización preferida, se usa la cromatografía de intercambio iónico en la que, en el caso de un intercambiador de cationes, la solución de carga tiene un pH entre el pKa de la función ácida del intercambiador de cationes y el pKa de la proteína que tiene el pKa más bajo de las proteínas en el extracto. En el caso de un intercambiador de aniones, el pH está entre el pKa de la función básica del intercambiador de aniones y el pKa de la proteína que tiene el pKa más alto de las proteínas que constituyen el extracto.

Mediante este procedimiento, todas las proteínas se unen al intercambiador de iones mientras que las impurezas neutras y las impurezas con la misma carga que la resina de intercambio iónico serán eliminadas.

20 En una realización preferida, al menos una etapa de purificación se realiza con una solución que comprende uno o más de un tensoactivo y/o un agente desnaturalizante. El agente tensoactivo puede ser no iónico, aniónico, catiónico o anfótero. Los agentes desnaturalizantes adecuados son agentes caotrópicos, agentes reductores y mezclas de los mismos. Los agentes de desnaturalización adecuados son, por ejemplo, urea, cloruro de guanidinio, etilenglicol, isopropanol. Una concentración adecuada de urea es 3 M o más, preferiblemente 4 M o más. Una concentración adecuada de guanidinio es preferiblemente 2 M, preferiblemente 3 M o más. Una concentración adecuada de etilenglicol y/o isopropanol es del 5 % o más, más preferiblemente del 10 % o más, hasta 20 % en peso.

30 En algunos casos, la producción del extracto purificado según el procedimiento parte I de la descripción es suficiente. Los extractos de este tipo pueden usarse para producir un diagnóstico *ex vivo/in vivo* e *in vitro*, tratamiento profiláctico y terapéutico de enfermedades alérgicas. Un aspecto adicional de la presente divulgación es un procedimiento para la producción de un hidrolizado de alérgeno, ya sea a partir de extractos según el procedimiento parte I o de cualquier otra fuente. Si el extracto proviene de cualquier otra fuente de alérgenos purificados que el procedimiento parte I, se requiere una etapa preliminar de desnaturalización para mejorar la digestibilidad.

Las etapas d) y e) se denominan procedimiento parte II.

35 Las ventajas del producto obtenido de este modo son que los péptidos son el resultado de la digestión de proteínas desnaturalizadas. Debido a una calibración de tamaño específico, tienen una potencia reducida para inducir una reacción alérgica inmediata y también una reacción proinflamatoria.

40 La desnaturalización, si es necesario, se realiza preferiblemente en presencia de agentes caotrópicos, agentes reductores o mezclas de los mismos. Los agentes caotrópicos adecuados son, por ejemplo, urea y cloruro de guanidinio. Los agentes reductores típicos son, por ejemplo, ditiotretitol, β-mercaptoetanol, tio-glicerol y mezclas de los mismos.

45 La etapa de hidrolización se realiza típicamente con una enzima. Las enzimas adecuadas son, por ejemplo, pepsina, tripsina, quimotripsina. Esta etapa de hidrolización puede realizarse en presencia de un agente caotrópico, preferiblemente también urea o cloruro de guanidinio. Durante la hidrolización, la concentración de urea y cloruro de guanidinio debe estar por debajo de 4 M, preferiblemente por debajo de 3 M.

En la etapa e) del procedimiento, se eliminan péptidos con un peso molecular mayor que 10.000 Da o menor que 1.000 Da.

50 Los péptidos del hidrolizado purificado, por lo tanto, comprenden péptidos con pesos moleculares entre 1.000 y 10.000 Da. Los procedimientos adecuados para eliminar péptidos grandes o pequeños son la ultrafiltración y la cromatografía de exclusión por tamaño. De nuevo, esta cromatografía de exclusión por tamaño puede realizarse en presencia de agentes caotrópicos, por ejemplo, urea, cloruro de guanidinio, etilenglicol, isopropanol y mezclas de los

mismos.

Una descripción adicional es un extracto de alérgeno que se puede obtener mediante la parte I del procedimiento. Típicamente también en este extracto las proteínas más dominantes en peso, que forman juntas al menos 60 % en peso de todas las proteínas, son al menos 2 proteínas, preferiblemente al menos 3 o 4 proteínas o más preferible al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10 proteínas. La pureza se observa por una densidad óptica a 260_{nm}: relación de densidad óptica a 280 nm de <1, preferiblemente <0,9, más preferiblemente entre 0,75 y 0,9.

El hidrolizado de alérgeno se puede usar para

- diagnóstico *in vivo* de enfermedades alérgicas: pruebas de punción, pruebas con inyecciones intracutáneas, conjuntivales, de aspiración e inhalación.

10 - diagnóstico *ex vivo* e *in vitro* de enfermedades alérgicas: kits de ELISA o estándares que se utilizan en las pruebas

- Tratamientos profilácticos y terapéuticos de enfermedades alérgicas: vacuna para tratamientos de desensibilización / hiposensibilización y modulación de la respuesta inmune con/sin combinación de adyuvantes.

Una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el extracto de alérgeno de la presente invención en forma hidrolizada. Adicionalmente, la composición farmacéutica puede comprender una o más de las siguientes sustancias: trifosfatos de nucleósido, difosfatos de nucleósido, monofosfatos de nucleósido, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, nucleósidos o análogos de los mismos, citoquinas inmunosupresoras, compuestos que inducen la expresión de inmunoproteasomas, 1,25-dihidroxitamina D3 o análogos de los mismos, lipopolisacáridos, endotoxinas, proteínas de choque térmico, tiorredoxina con NADPH o NADP-tiorredoxina reductasa, ditiotreitól, agonistas del receptor adrenérgico tales como salbutamol, antagonistas del receptor adrenérgico tales como butoxamina, compuestos que regulan la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, N-acetil-L-cisteína, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (L-glutación reducido), alfa-2-macroglobulinas, inductores de la expresión del gen Foxp3, flavonoides, isoflavonoides, pterocarpanoides, estilbenos como resveratrol, antagonistas del receptor de taquiquinina, inhibidores de la quimasa, adyuvante de vacuna tal como CpG o MPL o adyuvante tolerogénico tal como zimosano, beta-1,3-glucano, inductor de células T reguladoras, un agente mucoadhesivo para unir la partícula al revestimiento de la mucosa intestinal, tal como lectina vegetal, zinc, sales de zinc, polisacáridos, vitaminas y lisados bacterianos.

Con base en la fuente de alérgenos naturales en la composición, puede comprender alérgenos seleccionados entre alérgenos de polen, alérgenos de leche, alérgenos de veneno, alérgenos de huevos, alérgenos de malezas, alérgenos de pastos, alérgenos de árboles, alérgenos de arbustos, alérgenos de flores, alérgenos vegetales, alérgenos de granos, alérgenos de hongos, alérgenos de frutas, alérgenos de bayas, alérgenos de nueces, alérgenos de semillas, alérgenos de judías, alérgenos de pescado, alérgenos de mariscos, alérgenos de marisco, alérgenos de carne, alérgenos de especias, alérgenos de insectos, alérgenos de ácaros, alérgenos de moho, alérgenos de animales, alérgenos de garrapatas, alérgenos de gusanos, alérgenos de corales blandos, alérgenos de caspa de animales, alérgenos de nematodos, alérgenos de Hevea brasiliensis.

35 En una realización preferida, la composición farmacéutica se prepara para administración oral, para administración sublingual de fármacos, para administración entérica de fármacos.

Figura 1: Inmunorreactividad por transferencia de Western de IgG. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: extracto de proteína sin purificar, carril 3: extracto desnaturalizado de alérgeno purificado. Membrana bloqueada por BSA al 5 % y leche al 3 %. Suero del paciente diluido hasta 1/250. La unión de IgG se detectó por HRP anti-IgG humana de cabra diluida a 1/2.500 y revelada por sustrato de TMB. Alérgeno 1: \pm 61-54 kDa, Alérgeno 2: \pm 36-31 kDa.

Figura 2: Inmunorreactividad por transferencia de Western de IgE. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: extracto de proteína sin purificar, carril 3: proteínas purificadas. Membrana bloqueada por BSA al 5 % y leche al 3 %. Suero del paciente diluido hasta 1/5. La unión de IgE detectada por HRP anti-IgE humana de cabra diluida hasta 1/10.000 y revelada por sustrato de TMB. Alérgeno 1: \pm 61-54 kDa, Alérgeno 2: \pm 36-31 kDa.

Figura 3: Pico de exclusión del perfil de elución SEC G25. La relación del volumen de la columna / volumen de muestra fue de 12. La resina se equilibró con Tris.HCl 25 mM, urea 1,5 M, pH 8,0 a una caudal de 9 ml/min. La elución fue seguida por la absorbancia a 280 nm.

Figura 4: Perfil de proteína mediante SDS-PAGE. 4 - 12 % de gel Bis-Tris. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: extracto desnaturalizado de alérgeno purificado. Tinción realizada con Coomassie R-250.

Figura 5: Perfiles de proteína y de péptido por SDS-PAGE. 4 - 12 % de gel Bis-Tris. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: extracto desnaturalizado de alérgeno purificado (13 μ g), carril 3: hidrolizado (13 μ g). Tinción realizada con azul brillante de Coomassie R-250.

Figura 6: Perfil de elución G50 SEC. La columna se equilibró con urea 2 M, NaCl 100 mM, pH 3,0. Caudal 15 ml /

min. La relación del volumen de la columna / volumen de muestra fue de 10. La elución fue seguida por la absorbancia a 280 nm.

5 Figura 7: Curva de calibración para análisis por HPLC. Se inyectaron 10 µl de los siguientes estándares (1 mg / ml) en la columna BioSep-SEC S2000: 1. Albúmina de suero bovino (66 kDa), 2. β-Lactoglobulina (18,5 kDa), 3. Citocromo C (12 kDa), 4. Glucagón (3.5 kDa), 5. Péptido sintético de 1 kDa.

Figura 8: Perfil de HPLC de exclusión por tamaño. Columna: BioSep-SEC S2000 (PHENOMENEX). Regulador de elución: Na₂HPO₄ 50 mM - SDS al 0,5 % (p/v) pH 6,8. Caudal 1 ml/min. Detección a 214 nm. Se inyectaron 10 µl de las muestras. El área bajo la curva, entre los límites de 10 kDa y 1 kDa, se usó para calcular el porcentaje de los péptidos de interés.

10 Figura 9: Propiedades de alergenicidad de los productos derivados del polen. Se incubaron muestras de sangre de voluntarios alérgicos al polen con concentraciones crecientes (0, 1, 10, 100 y 1000 ng/ml) de extracto sin procesar de polen, proteínas purificadas de polen y péptidos purificados de polen. La expresión de la proteína gp53 se midió mediante citometría de flujo con regulación periódica en leucocitos positivos para IgE. Los resultados se expresan como % de células positivas para gp53 en células activadas (media ± desviación de 2 determinaciones).

15 Figura 10: Estimulación de la proliferación de PBMC humana por proteínas de polen y péptidos de polen. Las PBMC humanas purificadas de voluntarios alérgicos al polen se incubaron 5 días a 37°C en presencia de concentraciones crecientes (10, 30 y 90 µg/ml) de proteínas de polen o péptidos de polen. Se añadió [³H]-timidina al cultivo celular durante 16 horas y se midió la incorporación de [³H]-timidina con un contador beta usando el principio de centelleo líquido. Los resultados se expresan como la media de 5 determinaciones. El procedimiento de la presente invención se ejemplifica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Extracción

25 Se añadió polen al 1 % (p/v) (*Lolium perenne* de ALLERGON) a bicarbonato de sodio (12,5 mM) y se incubó durante 2 h bajo agitación. La solución se clarificó luego y se filtró añadiendo Celite (ACROS) al 2 % (p/v) y pasando a través de un filtro de 0,2 µm. Esta muestra constituye el extracto sin purificar.

La presencia de alérgenos en el extracto se analizó por transferencia de Western usando sueros de pacientes alérgicos al polen. Los epítomos de IgG e IgE se visualizan con anticuerpos anti-IgG o IgE humanos.

Como se muestra en la figura 1 y 2, hay dos alérgenos principales en el extracto.

30 Dicho extracto sin purificar se acidificó a pH 3,0 y se añadió Tween 20 (0,1 %, v/v). Esta muestra constituye el extracto acidificado.

Ejemplo 2: Purificación de proteínas alergénicas

El extracto de alérgeno se purificó por:

- Cromatografía de intercambio de cationes

35 Se equilibró una membrana Sartobind S[®] (SARTORIUS) con un volumen de lecho 28x (Bv) de bicarbonato de sodio 12,5 mM, citrato 30 mM, pH 3,0, Tween 20 0,1 % (v/v). Dicho extracto acidificado se cargó en la membrana equilibrada. La columna se lavó primero con 35x Bv de bicarbonato sódico 12,5 mM, citrato 30 mM, pH 3,0, Tween 20 al 0,1 % (v/v) y luego se lavó con 42x Bv de bicarbonato sódico 12,5 mM, citrato 30 mM, pH 3,0. Las proteínas se eluyeron con carbonato 0,1 M, cloruro de sodio 0,5 M, pH 9,15. La presencia de proteínas se siguió por la OD a 280 nm. Las fracciones de interés se combinaron.

40 - Precipitación con sulfato de amonio

Esta etapa se realizó a 0-4°C.

Se añadió una cantidad de sulfato de amonio para alcanzar el 90 % de saturación al producto bajo agitación. La agitación se detuvo después de la disolución completa de la sal. La suspensión se incubó durante la noche y se centrifugó 2 veces durante 15 minutos a 10.000 g. El sobrenadante se descartó cuidadosamente cada vez.

45 - Desnaturalización

Los sedimentos se resuspendieron a razón de 9 mg/ml en urea 6 M, DTT 10 mM, Tris.HCl 0,1 M, pH 8,0 y se incubaron a 37°C durante 1 h.

- Cromatografía de exclusión por tamaño en resina G25 (Sefadex fino de AMERSHAM)

La muestra desnaturalizada se cargó en la columna y las proteínas se eluyeron con Tris.HCl 25 mM, urea 1,5 M, pH

8,0.

La presencia de proteínas fue seguida por la medición de OD a 280 nm. Las fracciones de interés se combinaron para constituir el extracto de alérgeno desnaturalizado purificado.

5 El extracto de alérgeno purificado se analizó adicionalmente. El contenido de proteína (Ensayo de BCA) y el peso seco se determinaron para evaluar la pureza de la proteína. La eficacia de purificación también fue seguida por la eliminación de carbohidratos (prueba de Orcinol) y por la disminución de la relación OD₂₆₀ / OD₂₈₀.

Tabla 1: Eliminación de componentes no proteicos para formar un extracto purificado

	Relación proteína/peso seco	Relación OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Relación carbohidratos/ proteínas
Extracto crudo	16 %	1,3	400 %
Extracto Purificado	85 %	0,75	17 %

Como se muestra en la tabla 1, el proceso de purificación permite

- 10 - El aumento del porcentaje de proteínas en el extracto de ~ 15 % a 80 %
 - La relación OD₂₆₀ / OD₂₈₀ tiende a 0,5 caracterizando una proteína pura
 - Una eliminación significativa de carbohidratos (el contenido residual podría representar el residuo de carbohidrato de las proteínas).

15 La Figura 4 ilustra un perfil típico de SDS-PAGE obtenido para el extracto de alérgeno desnaturalizado purificado. Como se puede ver, 6 proteínas representan al menos 60 % del peso total de las proteínas en el extracto purificado.

Ejemplo 3: Hidrólisis de extracto de alérgeno desnaturalizado

El extracto se hidrolizó usando el siguiente protocolo:

Dicho extracto de alérgeno purificado se acidificó a pH 2,0. La digestión se realizó a 2,5 mg/ml de proteínas de polen y 1 Eu. Ph. U de pepsina (MERCK) para 337 mg de proteínas, a 37°C, durante 2 h.

20 La Figura 5 muestra una comparación entre el extracto purificado (carril 2) y el extracto hidrolizado (carril 3). Como puede verse, las proteínas de alto peso molecular correspondientes a proteínas desnaturalizadas no digeridas han desaparecido después de la incubación con pepsina.

Ejemplo 4: Purificación

Para eliminar los péptidos con un PM ≥ 10.000 Da y MW ≤ 1.000 Da, el hidrolizado se purificó mediante

25 - Cromatografía de exclusión por tamaño en resina G50 (Sefadex fino de AMERSHAM). Se añadieron al hidrolizado 16,5 % (v/v) de isopropanol y 0,1 M de NaCl. Esta muestra se cargó inmediatamente en una columna G50. Los péptidos se eluyeron y las fracciones que contenían los péptidos (PM ≤ 10 kDa) se agruparon como se muestra en la figura 6.

30 - Diafiltración sobre membrana 1kda (casete de ultrafiltración Omega PES de PALL). Los péptidos se concentraron 10 veces, se sometieron a diafiltración contra 10 volúmenes de Tris.HCl 50 mM, pH 7,4 y finalmente se concentraron 2,5 veces. Esta muestra constituye el hidrolizado de alérgeno purificado.

La eficacia de la purificación se controló mediante HPLC de exclusión por tamaño. Se equilibró una columna BioSep-SEC S2000 (PHENOMENEX) con Na₂HPO₄ 50 mM - SDS al 0,5 % (p/v) pH 6,8 con una caudal de 1 ml/min. Los péptidos se detectaron a 214 nm.

35 Los límites de 10 kDa y 1 kDa se calcularon a partir de una curva de calibración como se ejemplifica en la figura 7.

Como se muestra en la figura 8, los péptidos con un peso molecular entre 1.000 Da y 10.000 Da representan aproximadamente el 75 % de todos los péptidos en el hidrolizado purificado.

Ejemplo 5: Disminución de la alergenicidad

40 Las propiedades de alergenicidad del extracto sin purificar de polen (según el ejemplo 1), las proteínas de polen purificadas (según el ejemplo 2) y los péptidos de polen purificados (según el ejemplo 4) se evaluaron midiendo su capacidad para inducir la desgranulación de basófilos.

El ensayo se realizó *in vitro* en muestras de sangre humana fresca de voluntarios alérgicos al polen incubadas con concentraciones crecientes de extracto sin purificar de polen, proteínas purificadas y péptidos purificados. La desgranulación de basófilos se evaluó midiendo, mediante el procedimiento de citometría de flujo, la expresión del marcador de proteína gp53 en la membrana celular de células activadas (es decir, células positivas para IgE). Esta proteína normalmente está presente dentro de la membrana de los gránulos en las células en reposo y aparece en la superficie de la célula tras la activación celular (debido a la fusión de la membrana de gránulos con la membrana citoplasmática). Por lo tanto, se vuelve detectable por anticuerpos específicos anti-gp53 marcados. Como se muestra en la figura 9, los péptidos purificados son aproximadamente 30 veces menos alergénicos que las proteínas purificadas y 100 veces menos alergénicos que el extracto sin purificar de polen.

5

10 **Ejemplo 6:** Inmunogenicidad de las proteínas de polen y péptidos de polen

La inmunogenicidad de las proteínas y péptidos alergénicos se estudió midiendo su capacidad para estimular la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana.

Se cultivaron PBMC purificadas a partir de muestras de sangre de voluntarios "alérgicos al polen" mediante centrifugación en gradiente de densidad durante 5 días en placas de 96 pozos en presencia de concentraciones crecientes de proteínas de polen y péptidos de polen. El día 5, se añadió [³H]-timidina al cultivo celular y las placas se incubaron adicionalmente a 37°C durante 16 horas. La incorporación de [³H]-timidina se midió con un contador beta usando el principio de centelleo líquido.

15

Las proteínas de polen (de acuerdo con el ejemplo 2) y los péptidos de polen (según el ejemplo 4) estimulan la proliferación de PBMC humanas de una manera dependiente de la concentración de la dosis. La proliferación inducida por los péptidos alergénicos es ligeramente menor que la observada en respuesta a las proteínas. Estos resultados muestran que el proceso de producción de péptidos conserva la mayoría de los epítopos del alérgeno implicado en la activación de las células T.

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un hidrolizado de alérgeno purificado que comprende los pasos de
 - a) extraer una fuente natural de alérgenos que comprende proteínas alergénicas para formar un extracto,
 - b) purificación de dicho extracto para eliminar componentes no proteicos para formar un extracto purificado,
 - 5 c) desnaturalizar dicho extracto purificado para formar un extracto desnaturalizado purificado, en el que la desnaturalización se realiza con mezclas de agentes caotrópicos y agentes reductores,

dicho extracto desnaturalizado purificado comprende proteínas, en el que ninguna proteína individual es el 60 % o más (p/p) de todas las proteínas medidas por SDS-PAGE seguido de densitometría y todas las proteínas representan al menos 60 % (p/p) del peso seco del extracto desnaturalizado purificado medido por un ensayo de
 - 10 BCA,
 - d) hidrolizar dicho extracto desnaturalizado purificado con una enzima para formar un hidrolizado de alérgeno,
 - e) purificar dicho hidrolizado de alérgeno para eliminar péptidos con un peso molecular superior a 10.000 Da e inferior a 1.000 Da con el fin de obtener un hidrolizado purificado en el que el 70 %, más preferentemente el 80 % de los péptidos están entre 10.000 Da y 1.000 Da.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la extracción se realiza en una solución que no contiene sal o una sal seleccionada de carbonato, bicarbonato, fosfato, acetato, TRIS y HEPES y/o se realiza la extracción con un medio de extracción en el que el peso del medio de extracción es al menos 20 veces, preferiblemente 100 veces el peso de la fuente natural de alérgenos.
- 20 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el que la purificación comprende una o más de una etapa de cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel o cromatografía de exclusión por tamaño, una etapa de precipitación, una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba, una etapa de cromatografía de pseudo afinidad o afinidad o una etapa de diafiltración y/o en el que al menos una etapa de purificación se realiza con una solución que comprende un agente tensoactivo y/o desnaturalizante.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que la desnaturalización se realiza con mezclas de agentes caotrópicos y reductores seleccionados del grupo de urea, cloruro de guanidinio, ditiotreitól, tioglicerol, β -mercaptoetanol y mezclas de los mismos, preferiblemente en el que la concentración de urea es mayor a 4 M, preferiblemente mayor a 5 M y/o la concentración de cloruro de guanidinio está por encima de 3 M, preferiblemente por encima de 4 M.
- 30 5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la hidrólisis se realiza con una enzima, preferiblemente pepsina, tripsina o quimotripsina y/o en el que la hidrólisis se realiza en presencia de un agente caotrópico, preferiblemente seleccionado entre urea y cloruro de guanidinio.
- 35 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la eliminación de los péptidos se realiza mediante cromatografía de exclusión por tamaño y/o ultrafiltración, preferiblemente en el que la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño se realiza en presencia de un agente caotrópico, preferiblemente seleccionado entre urea, cloruro de guanidinio, etilenglicol, isopropanol y mezclas de los mismos.
7. Un hidrolizado de alérgeno purificado que se puede obtener por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Uso del hidrolizado de alérgeno de la reivindicación 7 para la preparación de una composición farmacéutica para inducir tolerancia, en el que la inducción de tolerancia se usa para curar o prevenir reacciones alérgicas.
- 40 9. Uso del hidrolizado de alérgeno de la reivindicación 7 para la preparación de una composición alimenticia para inducir tolerancia, en el que la inducción de tolerancia se usa para prevenir reacciones alérgicas.
10. Una composición farmacéutica que comprende un hidrolizado de alérgeno de la reivindicación 7.
- 45 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 que comprende adicionalmente al menos una sustancia seleccionada del grupo de trifosfatos de nucleósido, difosfatos de nucleósido, monofosfatos de nucleósido, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, nucleósidos o análogos de los mismos, citoquinas inmunosupresoras, compuestos que inducen la expresión de inmunoproteasomas, 1,25-dihidroxitamina D3 o análogos de los mismos, lipopolisacáridos, endotoxinas, proteínas de choque térmico, tioredoxina con NADPH o NADP-tiorredoxina reductasa, ditiotreitól, agonistas del receptor adrenérgico tales como salbutamol, antagonistas del receptor adrenérgico tales como butoxamina, compuestos que regulan la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, N-acetil-L-cisteína, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (L-glutatión reducido), alfa-2-macroglobulinas, inductores de la expresión del gen Foxp3, flavonoides, isoflavonoides, pterocarpanoides, estilbenos como resveratrol, antagonistas del receptor de taquiquinina, inhibidores de la quimasa, adyuvante de vacuna tal como CpG o MPL o adyuvante tolerogénico tal como zimosano, beta-1,3-glucano, inductor de células T reguladoras, un agente mucoadhesivo para
- 50

unir la partícula al revestimiento de la mucosa intestinal, tal como lectina vegetal, zinc, sales de zinc, polisacáridos, vitaminas y lisados bacterianos.

5 12. Una composición farmacéutica de las reivindicaciones 10 u 11 en la que los alergenos se seleccionan entre alergenos de polen, alergenos de leche, alergenos de veneno, alergenos de huevos, alergenos de malezas, alergenos de pastos, alergenos de árboles, alergenos de arbustos, alergenos de flores, alergenos vegetales, alergenos de granos, alergenos de hongos, alergenos de frutas, alergenos de bayas, alergenos de nueces, alergenos de semillas, alergenos de judías, alergenos de pescado, alergenos de mariscos, alergenos de marisco, alergenos de carne, alergenos de especias, alergenos de insectos, alergenos de ácaros, alergenos de moho, alergenos de animales, alergenos de garrapatas, alergenos de gusanos, alergenos de corales blandos, alergenos de caspa de animales, alergenos de nematodos, alergenos de Hevea brasiliensis.

10 13. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para administración oral, para administración sublingual de fármacos, para administración entérica de fármacos.

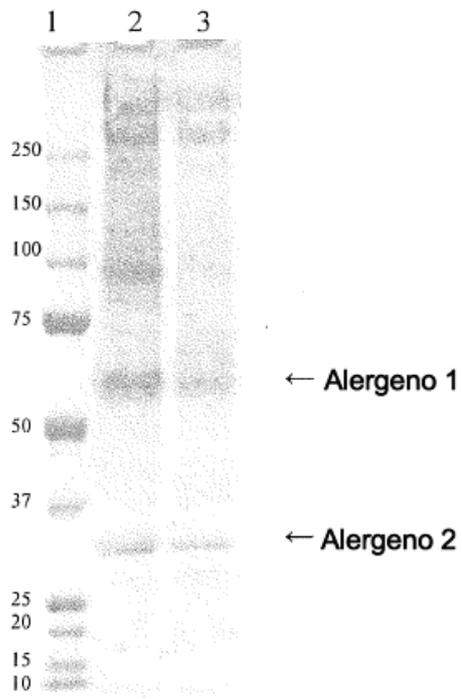


Fig.1

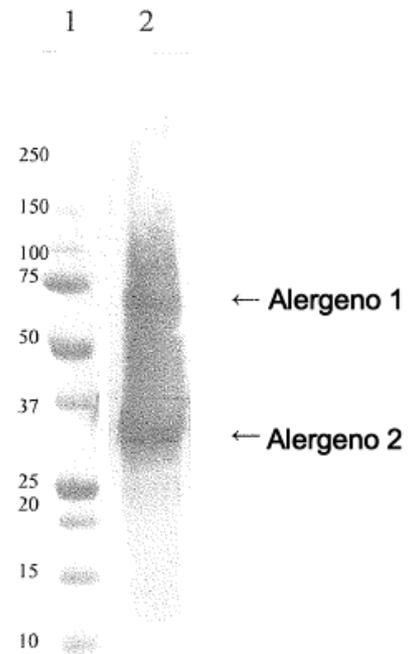


Fig.2

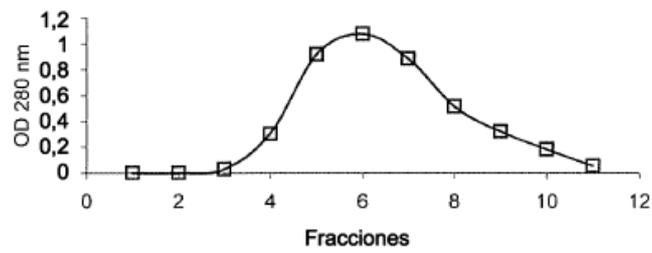


Fig.3

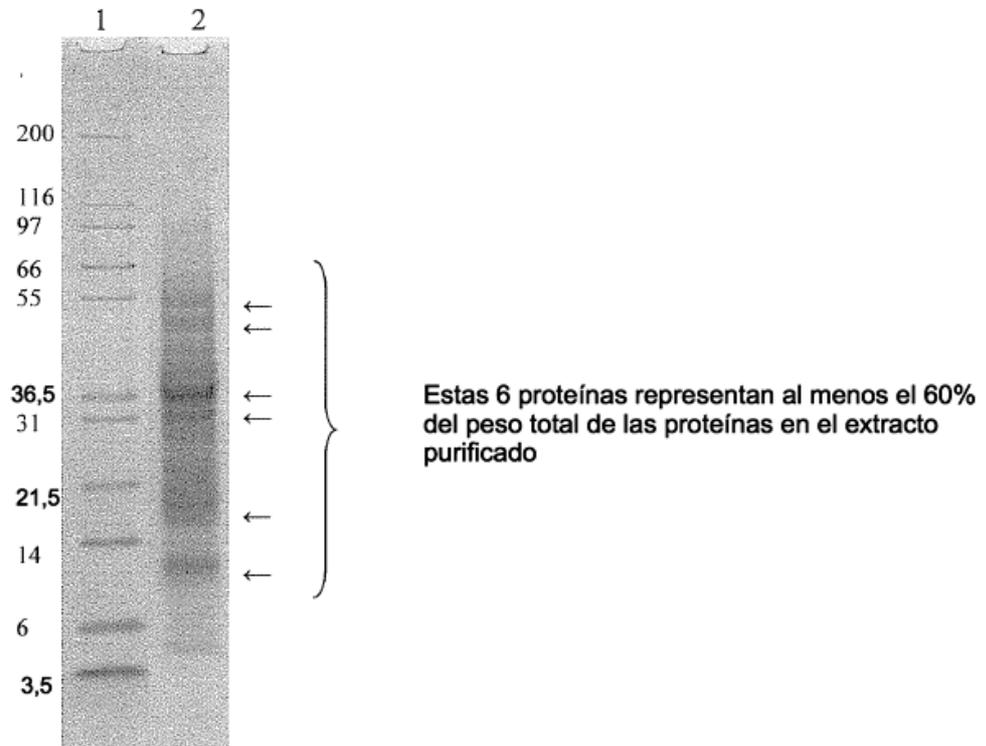


Fig.4

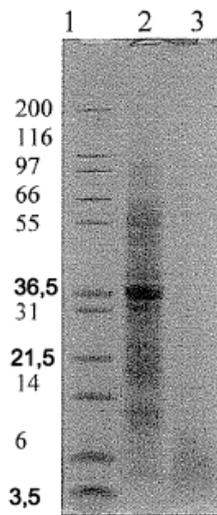


Fig.5

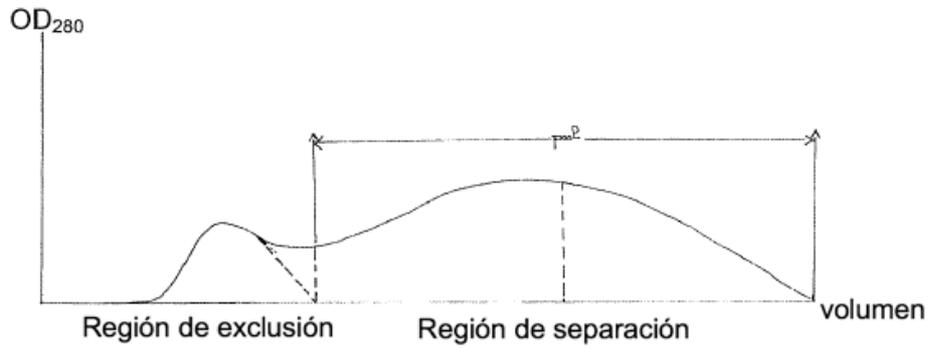


Fig.6

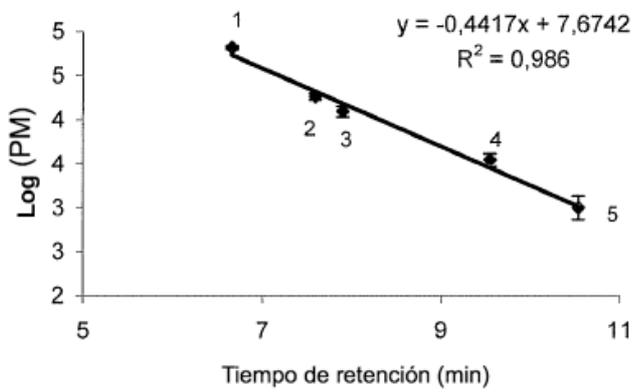


Fig.7

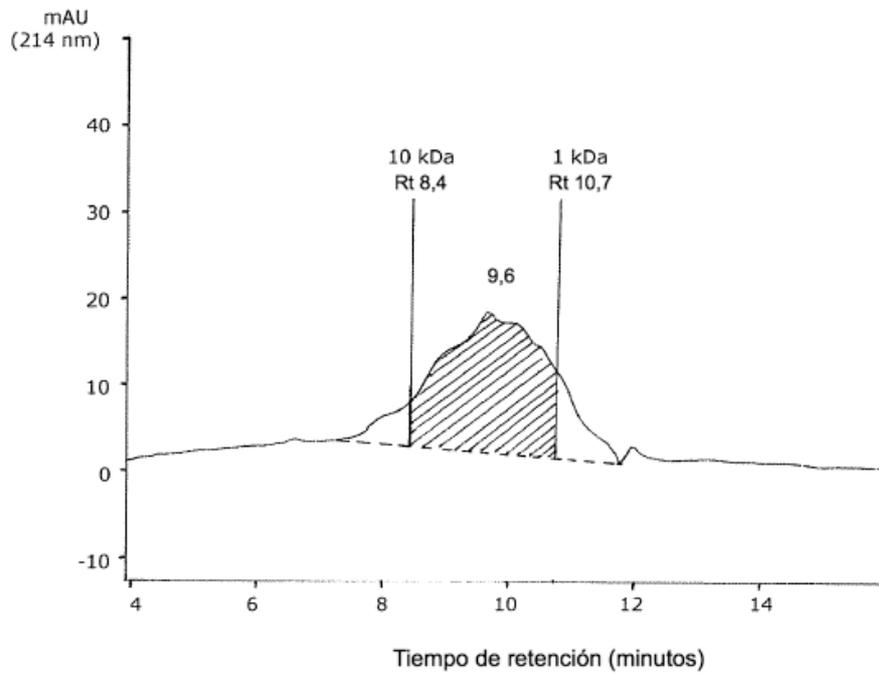


Fig.8

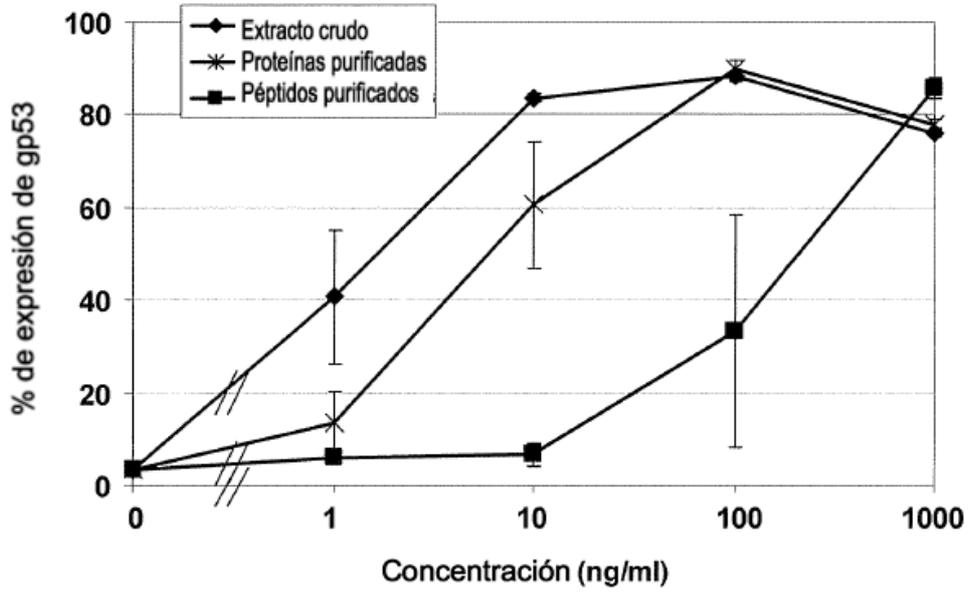


Fig.9

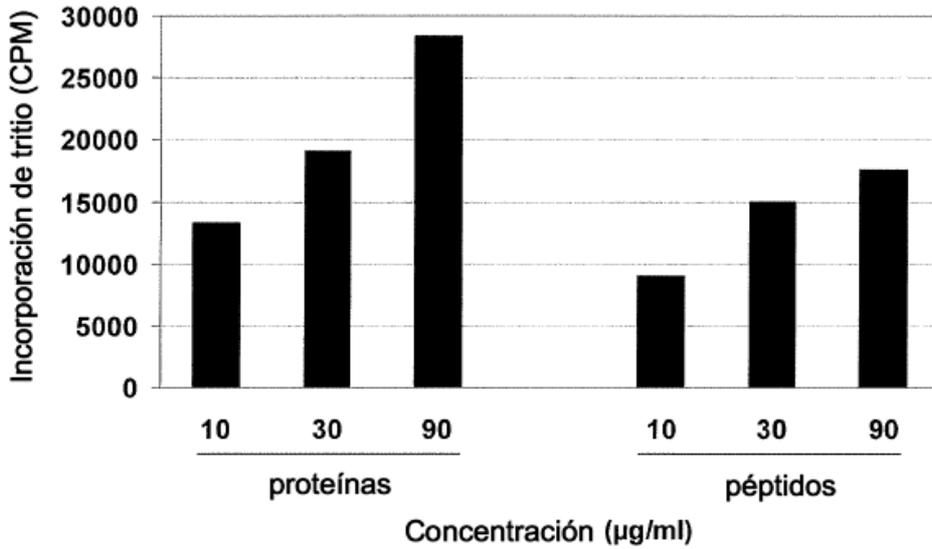


Fig.10